

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2009-14695

(P2009-14695A)

(43) 公開日 平成21年1月22日(2009.1.22)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	D
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543	5 O 1 A
GO 1 N 33/561 (2006.01)	GO 1 N 33/561	
GO 1 N 33/577 (2006.01)	GO 1 N 33/577	B

審査請求 未請求 請求項の数 4 書面 (全 5 頁)

(21) 出願番号	特願2007-196723 (P2007-196723)	(71) 出願人	598100346
(22) 出願日	平成19年6月29日 (2007. 6. 29)		横山 司甫
			東京都清瀬市中清戸5-72-11-4
		(72) 発明者	横山 司甫
			東京都清瀬市中清戸5-72-11-4

(54) 【発明の名称】 タイプIVコラーゲンNC1測定キット

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 試料中のタイプIVコラーゲンNC1領域(以下NC1)を高感度に測定する簡便な方法と試薬を提供する。

【解決手段】 試料中のNC1を抗NC1モノクローナル抗体と、抗NC1モノクローナル抗体もしくは抗NC1ポリクローナル抗体とのサンドイッチ法により免疫反応で検出する試薬キットであって、抗NC1モノクローナル抗体がELISA法でも、ウエスタンブロットでも、NC1と反応することを特徴とする試薬キット。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

試料中のタイプIVコラーゲンNC1領域(以下NC1)を抗NC1モノクロ-ナル抗体と、抗NC1モノクロ-ナル抗体もしくは抗NC1ポリクロ-ナル抗体とのサンドイッチ法により免疫反応で検出する試薬キット。

【請求項 2】

抗NC1モノクロ-ナル抗体がELISA法でも、ウエスタンブロットでも、NC1と反応することを特徴とする請求項1の試薬キット。

【請求項 3】

抗NC1モノクロ-ナル抗体を固相化抗体とした請求項2の試薬キット。

10

【請求項 4】

抗NC1ポリクロ-ナル抗体がモルモット由来である請求項1の試薬キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

試料中のタイプIVコラーゲンNC1(以下NC1)を高感度に測定することで、一次性腎炎及び糖尿病、高血圧などの二次性の腎炎の初期を捉える。

【背景技術】

【0002】

従来、試料中のNC1を測定する試薬キットは市場に無かった。従来 of 自験例では、バックグラウンドが高く、低濃度領域が測定できず、動物やヒト、培養液の試料の僅かな変化を捉えるには不便であった。例えば、試料を濃縮したり、きょう雑物を除く前処理が必要であった。

20

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

本発明者は、試料中のNC1を高感度に測定する簡便な方法と試薬を提供しようとするものである。

【課題を解決するための手段】

30

【0004】

本発明者は、NC1を非特異的反応を抑えて高感度に測定するには、適切な抗体の組合せで最適の結果が得られると考え、長い間、各種の動物からモノクロ-ナル抗体或いはポリクロ-ナル抗体を作製し、各種抗体の組合せ、濃度の適正化等々の実験を重ねて遂に高感度に測定する簡便な方法と試薬キットを完成するに至った。

【0005】

その結果、NC1の投与で惹起させた腎炎モデルや、従来からのマウスやラットの糖尿病ラットモデル、高血圧モデル動物でも腎臓に障害が起きると初期に血清や尿にNC1が観察された。

又、ヒトの腎炎でも糸球体疾患に限れば、原発性糸球体疾患の病型として抗糸球体基底膜(GBM)抗体腎炎を含む急性進行性糸球体腎炎、IgA腎症、膜性腎症、膜性増殖性糸球体腎炎、溶連菌感染後急性糸球体腎炎、微小変化型ネフロ-ゼ症候群、巣状糸球体硬化症をあげられる。又、二次性腎症としては、高血圧性腎症、糖尿病性腎症等があげられるが初期にはやはりNC1の検出が可能である。特に、糖尿病性腎症の初期を検出するには、早期の検体で、尿の微量NC1を測定するのが良い。

40

【0006】

腎糸球体の細胞外基質の主要成分は、タイプ4コラ-ゲンを主とするコラ-ゲン、ラミニン、プロテオグリカン、フィブロネクチンなどの糖蛋白質であり、メサンギウム基質と糸球体基底膜ではこれらの構成成分の割合が異なっているとされる(413頁、「細胞外マトリックス」メデイカルレビュー-社刊、1996)。

50

そこで、発明者は、腎系球体のタイプ4コラーゲンを構成しているNC1及びタイプ4コラーゲン三本鎖領域（N端の7S及び中央部螺旋域）は免疫系から隠された状態にあり露出することで抗原となり、原発性、二次性を問わず腎炎全ての隠蔽抗原（530頁、「標準免疫学」医学書院刊、1997）と成り得りと推定した。同時に露出したタイプ4コラーゲンはMMPsで分解されるので、断片としてNC1、7S及び中央部螺旋域を捉えることが可能であった。

【0007】

非特異的反応のバックグラウンドを下げ、低濃度域まで高感度にNC1を検出する最も望ましい方法と測定試薬キット。

試薬キットは、1)抗NC1モノクローナル抗体を固相化したマイクロプレート、2)標準NC1、3)ビオチン標識抗NC1抗体、4)アビジン標識HRP（酵素）、3)発色基質液（TMB）、4)反応停止液（1N硫酸）を用いたサンドイッチ形式のELISA法である。

10

【0008】

免疫反応として、最も望ましいのは、サンドイッチ形式のAB法ELISA法であるが、それに限定されず、RIA法、免疫発光法、沈降反応、凝集反応他でも良い。酵素免疫反応において標識の抗体としては、ポリクローナル又はモノクローナル抗体を問わないが、ポリクローナル抗体の時は由来動物はモルモット由来が最も望ましく、ウサギやヤギ由来のものでも良い。抗体の精製はアフィニティ精製が最も良いがプロテインAやGの精製でも良い。又それを放射性物質（RIA法）、発光物質で標識した物（免疫発光法）、無標識物（沈降法、凝集法）でも良い。

20

【0009】

反応形式は、サンドイッチ法が特に望ましいが、競合法他でも良いが高濃度から低濃度まで高感度に測定するのは困難である。

測定試薬の構成として、抗NC1抗体の固相化にはプレートが望ましいが、ガラスや磁性物質にしても良く、無しにして固相法を用いないことでも良い。

【0010】

この時、標準NC1は、ヒト腎臓由来が最も望ましいが、サル腎臓から得たものでも良い。更には、ウシ腎系球体から得たものでも良い。標準NC1の由来組織は腎臓が最も良く胎盤やその他の組織由来でも良い。

30

【0011】

プレートへの固相化抗体には抗NC1モノクローナル抗体が最も望ましく、固相化抗NC1モノクローナル抗体には、ヒト、サル、ウシ、ラット、マウスの各種動物由来のNC1の2つ以上と、固相化したNC1とELISA法で反応し、かつウエスタンブロット法で反応する抗NC1モノクローナル抗体が最も望ましい。固相化する時、間接コートにしコート物質をアビジン、ビオチン、又はこれらの結合した成分でも良い。又、抗NC1モノクローナル抗体を作製する抗原は、生体抽出物やリコンビナントのみでなく、構成ペプチド（特定分画、合成品を含む）でも良い。抗原の動物種としては、ヒトが望ましく、サル、ウシ、ブタ、ニワトリ、羊、ヤギ、ウサギ、ラット、マウス他の動物でも良くこれに限定されない。更に、抗原は、複数動物種を混合したものでも良い。抗原の由来臓器は、腎臓が望ましいが、これに限定されない。

40

【0012】

更に第二抗体は、抗ヒトIgA抗体が特に望ましく、抗ヒトIgG抗体も望ましいが、これに限定されず、抗ヒトIgM抗体、その他の抗ヒトイムノグロブリン抗体でも良く混合でも良い。測定対象がラットやマウスなどヒト以外の動物の時は、前述のヒト用試薬成分を対象動物に合わせて測定することができる。しかしサルの場合は、ヒト用をそのまま用いる事ができる。

【発明の効果】

【0013】

本発明の試薬キットは、バックグラウンドを低くし、かつ低濃度域のNC1を高感度に測

50

定することを可能とする。高感度なので試料を希釈しても測定でき、試料中に共存する反応阻害物も希釈されるので悪影響を抑制できる。例えば、腎細胞の培養などの低濃度のNC1の測定も可能である。血清や尿中のNC1測定は、糖尿病性腎症や高血圧性腎症の腎炎モデルで薬剤の治療評価や副作用評価に、ヒトの一次性や二次性の腎炎及び腎臓癌など腎疾患の初期検出を可能とする。

【実施例】

【0014】

1) 測定試薬キットの構成と測定手順

Anti-NC1 / Mono Abs (2 ug / ml) 100 ul / well (PBS) 1
夜 4 ~ 12 C

- Blocking (25% ブロックエース + 0.05% プロクリン)

- 使用時 wash (PBS + 0.2% Tween 20) x 4 回,

標準 NC1 100 ul / well

(希釈液; 10% ブロックエース / PBS + 0.05% プロクリン (+ 0.05% Tween 20)) RT x 2 hr

- wash x 4 回,

Anti-NC1 GP IgG - Biotin 100 ul / well

(0.95 mg / ml x 1000 (2段階希釈 x 10 x 100)) RT x 2 hr

- wash x 4 回,

Avidin - HRP 100 ul / well

(1 mg / ml x 4000 (2段階希釈 x 40 x 100)) RT x 30 min

- wash x 4 回,

基質液 (TMB+) 100 ul / well, RT x 20 min

停止液 (1M - H2SO4) 100 ul / well

- A 450 nm

2) 測定結果 1;

Lot . 7 A 2 5 : 製造年月日 2 0 0 7 1 2 5 製造後 1 か月目以降に測定

実験 No 7 0 2 0 2 (Lot . 7 A 2 5) 1 0 n g / m l ; O D 2 . 5 3 3 , 5 n g /
m l ; O D 1 . 4 0 3 , 1 n g / m l ; O D 0 . 3 5 8 , 0 . 5 n g / m l ; O D 0 . 2
2 4 , 0 . 2 5 n g / m l ; O D 0 . 1 6 7 , 0 . 0 6 n g / m l ; O D 0 . 1 1 6 , 0
n g / m l ; O D 0 . 0 9 1

実験 No 7 0 2 0 9 (Lot . 7 A 2 5) 1 0 n g / m l ; O D 2 . 7 0 9 , 5 n g /
m l ; O D 1 . 5 1 8 , 1 n g / m l ; O D 0 . 4 4 8 , 0 . 5 n g / m l ; O D 0 . 2
7 1 , 0 . 2 5 n g / m l ; O D 0 . 2 0 1 , 0 . 0 6 n g / m l ; O D 0 . 1 4 0 , 0
n g / m l ; O D 0 . 1 0 9

実験 No 7 0 2 2 3 (Lot . 7 A 2 5) 1 0 n g / m l ; O D 2 . 4 3 6 , 5 n g /
m l ; O D 1 . 4 0 1 , 1 n g / m l ; O D 0 . 4 1 4 , 0 . 5 n g / m l ; O D 0 . 2
7 5 , 0 . 2 5 n g / m l ; O D 0 . 2 1 4 , 0 . 0 6 n g / m l ; O D 0 . 1 7 1 , 0
n g / m l ; O D 0 . 1 2 0

実験 No 7 0 3 0 2 (Lot . 7 A 2 5) 1 0 n g / m l ; O D 2 . 7 3 0 , 5 n g /
m l ; O D 1 . 5 3 0 , 1 n g / m l ; O D 0 . 4 3 8 , 0 . 5 n g / m l ; O D 0 . 2
8 7 , 0 . 2 5 n g / m l ; O D 0 . 2 1 4 , 0 . 0 6 n g / m l ; O D 0 . 1 5 2 , 0
n g / m l ; O D 0 . 1 3 0

N = 4

10 ng / Ave	2 . 6 0 2	S D	0 . 1 4 2	C V	5 . 5
5	1 . 4 6 3		0 . 0 7 1		4 . 9
1	0 . 4 1 5		0 . 0 4 0		9 . 6
0 . 5	0 . 2 6 4		0 . 0 2 8		1 0 . 6
0 . 2 5	0 . 1 9 9		0 . 0 2 2		2 1 . 1
0 . 0 6	0 . 1 4 5		0 . 0 2 3		1 5 . 9

10

20

30

40

50

0.00 0.113 0.017 15.0

0 濃度の Ave + 2SD = 0.147

0.25 の Ave - 2SD = 0.155

結論

1) 製造後 1 か月で、10 ~ 0.25 ng/ml の低濃度を安定して測定できる。

2) キットの最低検出標準は 0.25 ng/ml とする。

3) 測定結果 2 ;

Lot.7C20 ; 製造年月日 2007 3 20 製造後 3 か月目以降に測定

実験 No 70605 1 (Lot.7C20) 10 ng/ml ; OD 2.379 , 5
ng/ml ; OD 1.258 , 1 ng/ml ; OD 0.340 , 0.5 ng/ml ; OD
0.222 , 0.25 ng/ml ; OD 0.173 , 0.06 ng/ml ; OD 0.13
1 , 0 ng/ml ; OD 0.098

10

実験 No 70612 1 (Lot.7C20) 10 ng/ml ; OD 1.808 , 5
ng/ml ; OD 1.012 , 1 ng/ml ; OD 0.309 , 0.5 ng/ml ; OD
0.209 , 0.25 ng/ml ; OD 0.171 , 0.06 ng/ml ; OD 0.12
6 , 0 ng/ml ; OD 0.086

実験 No 70615 1 (Lot.7C20) 10 ng/ml ; OD 2.019 , 5
ng/ml ; OD 1.061 , 1 ng/ml ; OD 0.262 , 0.5 ng/ml ; OD
0.153 , 0.25 ng/ml ; OD 0.110 , 0.06 ng/ml ; OD 0.06
7 , 0 ng/ml ; OD 0.042

20

N = 3

10 ng / Ave 2.068 SD 0.289 CV 14.0

5 1.110 0.130 11.7

1 0.304 0.039 12.8

0.5 0.195 0.037 19.0

0.25 0.151 0.036 23.8

0.06 0.101 0.036 35.6

0.00 0.083 0.016 19.2

結論

1) 製造後 3 か月で、10 ~ 0.25 ng/ml の低濃度を安定して測定できる。

30

专利名称(译)	iv型胶原蛋白nc1测量套件		
公开(公告)号	JP2009014695A	公开(公告)日	2009-01-22
申请号	JP2007196723	申请日	2007-06-29
[标]申请(专利权)人(译)	横山 司甫		
申请(专利权)人(译)	横山 司甫		
[标]发明人	横山司甫		
发明人	横山 司甫		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/561 G01N33/577		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/543.501.A G01N33/561 G01N33/577.B		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种用于高度灵敏地测量样品中IV型胶原蛋白NC1区（以下称NC1）的简单方法和试剂。用于通过抗NC1单克隆抗体和抗NC1单克隆抗体或抗NC1单克隆抗体，抗NC1单克隆抗体的夹心法进行免疫反应检测样品中NC1的试剂盒 一种试剂盒，其特征在于无效抗体在ELISA和Western印迹法中均与NC1反应。[选择图]无